

(54) PRODUCTION OF PROBE FOR IDENTIFYING NUCLEIC ACID

(11) 5-184395 (A) (43) 27.7.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-26217 (22) 16.1.1992
 (71) NISSHINBO IND INC (72) SOICHIRO TAKENISHI(5)
 (51) Int. Cl⁵. C12Q1/68//C07H21/04

PURPOSE: To obtain the subject uniformly labeled probe by simple procedure by linking a labeled compound to a reactive functional group of a nucleoside triphosphate derivative taken in nucleic acid chain by a specific method without using a radioactive compound.

CONSTITUTION: First, a nucleoside triphosphate derivative containing a reactive functional group (e.g. 5-(3-aminopropyl)-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate) is taken in a nucleic acid chain by polymerization reaction using an enzyme. Then the reactive functional group of the nucleoside triphosphate derivative taken in the nucleic acid is linked to a labeled compound. A reverse transcriptase or DNA polymerase is used as the enzyme. Fluorescein isothiocyanate may be cited as the labeled compound.

**(54) METHOD FOR DIAGNOSIS USING EPIDERMAL TYPE
 TRANSGLUTAMINASE RNA AS PROBE**

(11) 5-184396 (A) (43) 27.7.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-6358 (22) 17.1.1992
 (71) ADVANCED SUKIN RES KENKYUSHO K.K.
 (72) KIYOBUMI YAMANISHI(4)
 (51) Int. Cl⁵. C12Q1/68,C12N15/54

PURPOSE: To detect keratinization of cell and an advanced state of tumor.

CONSTITUTION: In situ hybridization of human tissue fragment, a labeled NRA sequence derived from human epidermal transglutaminase RNA is used as a probe to diagnose derivation and degree of differentiation of cell.

**(54) CHRONICALLY ACTIVE HEPATITIS B VIRUS AND METHOD FOR
 DETECTING THE SAME**

(11) 5-184400 (A) (43) 27.7.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 4-25887 (22) 17.1.1992
 (71) TSUMURA & CO (72) MASAO KOMATA(1)
 (51) Int. Cl⁵. C12Q1/70,C12N7/00,C12Q1/68,G01N33/50//A61B10/00,A61K39/29,
 C12N15/00,C12N15/51

PURPOSE: To diagnose whether a hepatitis B virus causes active hepatitis or not by deproteinizing blood, etc., to be estimated to have hepatitis B virus, extracting DNA of hepatitis B virus and determining the base sequence of its DNA.

CONSTITUTION: A hepatitis virus is collected from blood or serum to be estimated to have hepatitis B virus, deproteinized and the base sequence of its DNA is determined to diagnose wherein the virus is chronically active hepatitis B virus or not.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184396

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	8114-4B		
C 1 2 N 15/54	ZNA	8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数2(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平4-6358

(22)出願日 平成4年(1992)1月17日

(71)出願人 591062065

株式会社アドバンストスキンリサーチ研究所

神奈川県横浜市金沢区福浦2丁目12番地1

(72)発明者 山西 清文

京都府京都市上京区寺町通今出川上ル2丁目本満寺町 58-103号室

(72)発明者 福島 正二

東京都町田市鶴間1-9-9

(72)発明者 平野 二郎

茨城県牛久市岡見町1579-2

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 表皮型トランスグルタミナーゼRNAをプローブとする診断方法

(57)【要約】

【目的】 細胞の角質化や腫瘍の進行状況を検出する診断方法を提供する。

【構造】 ヒト組織切片のイン シトゥ ハイブリダイゼーションにおいて、ヒト表皮トランスグルタミナーゼRNAに由来する標識されたRNA配列をプローブとして使用する細胞の由来および分化度を診断する方法を提供する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A) ヒト表皮型トランスグルタミナーゼRNAに由来する標識されたRNA配列をプローブとして用意する工程、

(B) 前記プローブでヒト組織切片にハイブリッド形成を行う工程、ならびに

(C) ヒト組織切片中の被検細胞およびそれに対応する対照細胞のハイブリッド形成状態を比較する工程、を含んでなる被検細胞の由来または分化度の診断方法。

【請求項2】 前記標識されたRNA配列が、配列番号1におけるヌクレオチド番号204～2734の配列に由来し、かつ連続した少なくとも20個のヌクレオチドを含んでなる請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、RNA配列の利用に関し、より具体的には、ヒト表皮型トランスグルタミナーゼ（以下、「ヒト表皮型TG」と略称する場合もある）のアンチセンスRNA配列に由来するヌクレオチド配列およびその配列を使用する細胞の由来または分化度の診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 組織を構築する細胞の由来、分化度を明確にすることは、その細胞の分化の異常を知る手がかりとなり、細胞の角質化や特定の腫瘍の進行状況を検出または診断する上で重要な意義を有する。例えば、上皮性悪性腫瘍の場合には、その分化度によって高分化癌、中分化癌、低分化癌と類別され、そして特定の癌細胞はその発生した組織本来の細胞が形態的、機能的に分化した状態によって腫瘍化の進行度合いが分かる。

【0003】 高分化腫瘍細胞では、それらの細胞が発生した組織や器官の正常細胞に近い形態や機能にまで分化しており、腫瘍化は進んでいない。一方、肺癌の低分化類表皮癌では、それらの細胞が異形成の強い腫瘍細胞からなり、腫瘍化が進んでいる。上皮性悪性腫瘍の中、皮膚、陰茎、口唇に発生する扁平上皮癌は、悪性度が低いものの子宮頸部、鼻咽頭部、食道の上皮に発生する扁平上皮癌は悪性度が高いといわれている。

【0004】 従来、細胞の起源、分化度を調べる方法としては、ヘマトキシリン-エオシン染色や各種染色法、ケラチンやビメンチンにたいする免疫組織化学的染色法等（例えば、「免疫病理診断方法」（基礎と実際）、医学書院サウンダース、1987、331～346ページおよび352～353ページ、参照）が用いられてきた。

【0005】 また、かかる方法を用いて血中の癌胎児性抗原（Carcinoembryonic antigen；以下「CEA」と略称する）を測定するCEAの定量的追跡は、癌組織の消長、転移、再発の発見、化学療法や放射線療法などの効果判定に用いられ、臨床上、結腸癌、胃癌、脾癌、肺癌

2

などの診断に広く活用されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 最近の研究によれば、CEAは必ずしも消化器癌に特異的ではなく、乳癌、肺癌、膀胱癌、前立腺癌、卵巣癌、甲状腺癌など多くの腫瘍にも存在することが明らかにされてきた。また、CEAと類似の構造を持ち、免疫学的に部分交差反応を示す物質（CEA関連抗原）も正常肺、脾、糞便、胆汁などから発見されてきた。そのため、これらCEA関連抗原中には、通常の免疫操作で得られる抗CEA血清ではCEAと識別できないものもある。

【0007】 一方、悪性腫瘍の進行度合いを組織上で形態的に診断し、また腫瘍細胞の局在を組織上で明示することはかなり難しい。例えば、皮膚に原発する上皮性悪性腫瘍である扁平上皮癌、有棘細胞癌などの場合には、表皮細胞は角化過程によって細胞形態が少しずつ変化してゆくが、細胞の起源または分化度を明示するには相当の技術と経験を要し、とくに細胞が未分化な場合、従来の各種染色法、免疫組織学的染色法によりそれらの腫瘍細胞の局在部位を特定することは困難な場合が多い。

【0008】 そこで、本発明の目的は、細胞の由来または分化度を特異的、かつ容易に診断できる方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、ヒト表皮細胞の分化（角化）過程において発現し、ロリクリンやインボルクリン等の基質蛋白をε-（γ-グルタミル）リジン結合によって、細胞膜直下に強靱なコーニフィドエンベロプ（不溶性膜）を形成し、最終的に角化を完了させる、ヒト表皮TGのcDNAをクローニングして、その一次構造を明らかにした（Biochem. Biophys. Res. Commun., 175, 3, 1991, 906-913ページ、参照）。

【0010】 なお、この酵素は扁平上皮において、その分化にともなって発現するものである。本発明者らはこのヒト表皮TGのcDNAの利用についてさらに研究を重ねたところ、このcDNAを基に作製したアンチセンスRNA配列がヒト組織切片において、選択的なインシトゥ（*in situ*）ハイブリッド形成をおこし、正常細胞のヒト表皮TGの局在形態と被検細胞のヒト表皮TGの発現およびその局在形態を比較することにより、扁平上皮型の細胞の由来、その分化度の診断に使用できることを見出し本発明を完成した。

【0011】 従って、本発明によれば、(A) ヒト表皮型トランスグルタミナーゼRNAに由来する標識されたRNA配列をプローブとして用意する工程、(B) 前記プローブでヒト組織切片にハイブリッド形成を行う工程、ならびに (C) ヒト組織切片中の被検細胞およびそれに対応する対照細胞のハイブリッド形成状態を比較する工程、を含んでなる被検細胞の由来または分化度の診

3

断方法が提供される。

【0012】以下、本発明を具体的に説明する。本発明により提供される方法で用いるRNA配列は、ヒト組織における前記TGの発現に關与するmRNAと選択的にハイブリッドを形成するものであれば、その由来および作製方法に無関係に使用できるが、具体的には、後述の配列表の配列番号1に由来するものを挙げることができる。ここで、由来するものの具体例としては、配列番号1で示されるRNA配列におけるヌクレオチド番号204～2734の範囲内の配列から選ばれるものであつて、かつ連続した少なくとも20個のヌクレオチドを含んでなるすべての配列を挙げることができる。従って、本発明のRNA配列には、上記204から2734までの連続した配列全体からなるものをはじめ、例えば、204から223までの連続した部分配列のみからなるものも包含される。

【0013】これらの配列は、後述する作製方法に従って、表皮型TG cDNAを適当な制限酵素処理など既知の方法により得た表皮型TG DNA断片を用いて得ることができるし、得られたアンチセンスRNAを適当な制限酵素で処理することにより得ることもできる。また、記載した配列に沿って、それ自体既知の方法で化学合成することもできる。こうして作製されるRNA配列は、その配列中に少なくとも20個のヌクレオチドを含むものであれば、上記ヒトTGの発現に随伴するmRNAと選択的にハイブリッド形成が可能である。

【0014】すなわち、本発明の診断方法では、上記RNA配列が標識されたものであって、ヒトTGの発現に随伴するmRNAに相補的なヌクレオチド配列を有するものがプローブとして用意される。標識としては、本発明のRNA配列がヒト組織上の上記mRNAとハイブリッド形成を行ったとき、それを顕在化できるものであればいずれも使用できるが、一般的にヌクレオチド類の標識として使用されている放射性標識または非放射性標識を使用することができる。また、標識方法もそれ自体既知の方法に準じて行うことが好都合である。例えば、標識および標識方法については、「現代皮膚科学体系」、1989-B版、中山書店、76～81ページを参照されたい。

【0015】限定されるものでないが、放射性標識としては、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I または ^{32}P などの放射性同位体で標識されたヌクレオチド類、例えば、 $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ アデノシン5'-三リン酸、 $[\text{8}-^{14}\text{C}]$ アデノシン5'-三リン酸、 $[\text{2}-^3\text{H}]$ アデノシン5'-三リン酸、 $[\text{2}, \text{8}-^3\text{H}]$ アデノシン5'-三リン酸、 $[\text{5}', \text{8}-^3\text{H}]$ アデノシン5'-三リン酸、 $[\text{8}-^3\text{H}]$ アデノシン5'-三リン酸、アデノシン5'- $[\alpha-^{32}\text{P}]$ 三リン酸、アデノシン5'- $[\gamma-^{32}\text{P}]$ 三リン酸、アデノシン5'- $[\alpha-^{35}\text{S}]$ チオ三リン酸およびアデノシン5'- $[\gamma-^{35}\text{S}]$ チオ三リン酸

4

ン酸が挙げられ、また、非放射性標識としては、ビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェノール、N-アセチルアミノフルオレッセンおよびスルホンなどが挙げられる。

【0016】これらの標識化合物を用いて本発明のRNAプローブを調製する方法としては、バクテリオファージDNA依存性RNAポリメラーゼを用いる方法、例えば、SP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼなどを用いる方法があり、また、合成したRNA鎖を標識する方法として、末端の標識、例えば、ポリヌクレオチドキナーゼによる5'末端への放射性標識リン酸の結合、ビオチン化などが挙げられる（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), 2, 10.1～10.70 ページ, 1989」、参照）。

【0017】次に、こうして調製されたプローブを使用してヒト組織切片にハイブリッド形成、いわゆるインシトゥ (*in situ*) ハイブリダイゼーションが行われる。上記ヒト組織切片は、その組織中に存在するTGに随伴する対応するmRNAと本発明のプローブがハイブリッド形成し、その態様を検出できるものであれば、調製方法および形態の如何を問わないが、次のように調製されたものを使用することが好ましい。例えば、標的組織（被検細胞を含む）を凍らせクリオスタットで薄切した凍結切片、組織中にパラフィン浸透させ固まらせた後、ミクロトームで薄切したパラフィン包埋切片などが使用できる。これらの組織は凍結切片の場合は凍結前、もしくは薄切後に固定を行い、パラフィン包埋切片の場合はパラフィン包埋前に組織の固定を行う。固定法は、薄切後にアセトン固定、メタノール固定などを行ってもよく、また、組織の状態で固定する場合にはホルマリン固定、パラホルムアルデヒド固定、グルタルアルデヒド固定、およびこれらの混合固定を行ってもよい。さらに、組織切片は使用する組織や固定法に応じて界面活性剤やタンパク質分解酵素処理などにより、mRNAを露出させることが必要となる場合もある。

【0018】こうして調製されたヒト組織切片への上記プローブを使用するハイブリッド形成反応は、既知のインシトゥ ハイブリダイゼーション法に従って、適当なハイブリダイゼーション緩衝液中で行うことができる。次に、こうしてヒト組織切片中に形成されるハイブリッドの形成状態を被検細胞と対照細胞との間で比較観察して、その差違に基づき前者の細胞の由来または細胞の分化度を定性的に診断することができる。

【0019】例えば、ヒト表皮TGの発現は、表皮をはじめ、上皮系細胞に認められるので、このTGの発現がみられる組織の由来はそれに因って分かる。なお、実際の組織診断においては、患部組織のインシトゥ ハイブリダイゼーション検査と同時にその周辺の正常組織の検査も行い、両者の組織像結果を比較することに因っ

5

て、分化度を判定することが簡便である。

【0020】分化度は、皮膚、食道、子宮頸部などの器官組織により、また分化の状態に応じて異なるので、一律の分化度標準を設定することは困難である。しかしながら、従来の方法、例えばヘマトキシリン-エオシン染色法を使用する場合には、ヘマトキシリンで細胞核を青紫色に、エオシンで細胞質や細胞間物質を赤色に染め、次いでその形態に因って、患部組織と正常組織とを比較して細胞の由来や分化度を判断する必要があるのに比し、ヒト表皮TGという、明らかに細胞の分化にかかわる酵素の発現量をmRNAのレベルで判定することができる本発明の方法によれば、上皮系細胞の由来およびその分化度を明確に判定することが出来る。なお、本発明のRNA配列（アンチセンスRNA配列由来）による正常細胞のハイブリッド形成に加え、センスRNA配列に由来するプローブを使用して被検細胞に対してハイブリッド形成を試みた結果を、上記判定に使用することでその診断方法の精度はさらに高められる。このような細胞の由来または細胞の分化度を診断する標的細胞（被検細胞）としては、ヒト表皮TGの発現を伴うものであれば

すべて対象とすることができるが、より具体的なものとしては皮膚細胞、口腔粘膜上皮細胞、食道上皮細胞、鼻咽頭上皮細胞、陰茎皮膚細胞および子宮頸管粘膜上皮細胞などが挙げられる。

【0021】上述の診断法にも使用することができるRNA配列の出発原料アンチセンスRNA配列とセンスRNA配列の作製方法は、限定されるものでないが例えば、次のように実施することができる。

ヒト表皮TGのcDNAクローニング

1) 部分cDNAフラグメントのPCR法による増幅
正常ヒト皮膚ケラチノサイト（三光純薬社）を 3.6×10^5 cell/30mLKGMの割合で直径15cmのプレートに植え付け、2日間培養し、その後、培地のカルシウムイオン濃度を1mMに調製したKGM中でさらに6日間培養した細胞よりグアニジンチオシアネート法により全RNAを精製した。その後mRNA純化キット（ファルマシア社）のオリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィーによりポリ(A)⁺RNAを精製した。

【0022】ウサギ表皮トランスグルタミナーゼ、モルモット肝トランスグルタミナーゼおよびヒト因子XIIIaに保存されているアミノ酸配列を基にして、DNAシンセサイザー381A（アプライドバイオシステム社）で合成した2種のプライマー（TG#1とTG#3C、図-1、参照）を用い、上述の正常ヒト表皮ケラチノサイトより精製したRNAから作製したcDNAに対して常法の加温サイクル（94℃1分、55℃1分、72℃2分を25サイクル）によりPCRを行った。増幅されたフラグメントは5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離、解析した。また、フラグメントをpGEM4Zベクター（プロメガ社）にクローニングし、ジデオキ

6

シ法によりシークエンスし、トランスグルタミナーゼの部分塩基配列であることを確認した。（なお、図中および配列表中のアミノ酸およびヌクレオチドは、それぞれ当該技術分野で慣用されている一文字記号を用いて表示している。）

2) cDNAクローニングとシークエンス

cDNAライブラリーは、上述の方法により精製したRNAを鋳型として用いcDNAを合成し、SUPERS CRIP Tプラスミドシステム（BRL社）により、指向性ファージ化ベクターであるpSPORT1を使用して構築した。ヒト表皮トランスグルタミナーゼcDNAを持つクローンのスクリーニングは、上述の部分cDNAフラグメントをニックトランスレーションにより³²Pでラベルしたものをプローブとして行った。その結果、14個の陽性クローンが得られ、その中で最長インサート（2.7kb）を持つクローン（pHETG-Mとする）をシークエンスし、トランスグルタミナーゼの全長が含まれていることを確認した。

【0023】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれによって限定されるものでない。

例1 cDNAを基にRNAプローブの調製

ヒト表皮トランスグルタミナーゼをコードするDNA配列を持つpHETG-Mクローンを制限酵素EcoRIで切断し一本鎖にした後、DIG RNAラベリングキット（ベリンガー社）に示された方法に従いSP6 RNAポリメラーゼ反応を行い、ジゴキシゲニンラベルしたアンチセンスRNAプローブを作製した。このプローブのRNA配列を配列表の配列番号1に示した。また、TGmRNA検出時におけるコントロールとして、このRNAの相補的な配列（センスRNA配列）を先のキットのT7 RNAポリメラーゼを使い作製した。

【0024】これらのRNA配列は、上記のように標識されたRNAを上述したような連続した少なくとも20個のヌクレオチドからなる配列を調製して本発明で用いるプローブとすることができる。なお上記cDNAクローニングに際しては、pSPORT1に代えて種々のベクターが使用できるが、それらの具体的なものとしては、プロモーターとしてT7およびT3を有するpKM N、pBLUESCRIPT II、pBS(+/-)およびpT3T7、ならびにプロモーターとしてT7およびSP6を有するpSPT18およびpST19を使用してもよい。

例2 ヒト組織切片の診断

診断に供した組織切片は82歳女性の右鼠径リンパ節に生じた3cm径の腫瘍およびその周辺の正常表皮より手術的に切除した組織をドライアイスで急速凍結し、樹脂に包埋後樹脂ごとさらに凍結させ、クリオスタットで-20℃において6μmに薄切しスライドガラスに乾燥密着

10

20

30

40

50

7

させ作製した。

【0025】組織切片をハイブリダイゼーション緩衝液（50%脱イオン化ホルムアミド、0.1%超音波処理したサケ精子DNA、0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸ナトリウム、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、0.2%フィコール、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）に室温で1時間浸しプレハイブリダイゼーションを行った。その後、ハイブリダイゼーション緩衝液にプローブとしてジゴキシゲニン標識RNA溶液を加え、組織切片と37℃16時間湿潤箱中で反応させた。未反応のプローブ溶液は0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸ナトリウム溶液で40℃、30分間づつ、4回浸すことを繰り返して洗い流した。

【0026】ハイブリダイゼーションの終了した組織切片上のTGM RNAとジゴキシゲニン標識RNAとのハイブリッドをジゴキシゲニン検出キット（ペーリンガー社）に示されている方法に従い、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体とアルカリホスファターゼの基質である5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸と4-ニトロブルー-テトラゾリウムクロリドを用い検出し顕微鏡観察を行った。

【0027】その結果、アンチセンスRNAプローブを用いたヒト表皮TGM RNAの発現量は正常表皮においては、表皮の基底層およびその直上の有棘層には少なく、有棘層の上層に向かうにしたがって多くみられ、顆粒層では特に強い発現が認められた。これに対し、腫瘍部位では腫瘍実質細胞にヒト表皮TGM RNAの強い発現がみられ、間質部分には認められなかった。

10

20

*

8

*【0028】また、比較例として、アンチセンスRNAの代りにセンスRNAプローブを用いてハイブリッド形成を行った。その結果、正常部位と腫瘍部位と共にアンチセンスRNAプローブを用いたときに観察されたハイブリッド形成はほとんど認められなかった。次に、この正常ヒト表皮組織における角化の過程で発現するヒト表皮TGの局在形態と腫瘍部位における局在形態と比較した。

【0029】その結果、患部細胞の由来および分化度より、この腫瘍は表皮由来の高分化型転移性有棘細胞癌（扁平上皮癌）であると診断した。この様に、本発明による診断法は従来の組織染色法で診断する場合のように長い経験によることなく、またCEA測定のように非特異性による不確実性が残る診断より信憑性の高い診断法であると言える。

【0030】

【発明の効果】本発明により、上皮細胞における由来、分化度を明らかにすることによって上皮細胞における分化異常とその存在部位を細胞単位で顕在化し、従来の長い経験によることなく、また非特異性による不確実性を残すことなく、精度高く診断することが出来る。

【0031】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2734

配列の型：核酸

鎖数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：アンチセンスmRNA

配列

UUUUUUUUUU UUUUUUUUUU UUUUUCAUUA AAAACAGUU UAUUAGCAUC	50
UGUUCUUUUU GUGCAAGUGA AGACUGACUC CCUCUCCGGG AGCCUUGGAC	100
UCCCCACUG AGCUCCUGGG GAGCUGUCUCU GUAGUGUGCC CCUAUCUUGG	150
GGCAAUGUCC UUGCUCUUCU GACUCCAGUC CCAUUGCUCC UGGCACAGGG	200
CUAAGCUCCA CCUCGAGAUG CCAUAGGGAU GGUCUCUCCU AAGUGACUGU	250
CACCUCCAGC GUCUGAGAAG AAGCCCCAU CCCAGGGGC UGGGGCCACA	300
UCCACCUUGA UGACACCGUG CACCUUGGGAG AGCUGUGGGC UGUCCAAGCU	350
GGCAAUGAGC UGGCGGGGGC CUGGUCGCAC AGGCACAAAC GACUGGCGCA	400
GUGUCACUGU UUCAUUGCCU CCAUUGUCCC CAACGUUGAG GAUCUUGGGC	450
CUCUGUAACC CAGAGCCUUC GAGCCGGAAG ACGACAUUGG UGAGGGUGAC	500
GGGAAGGGGG UUCUUGAAGA CAAUCUGUAC UUCACACUCC UGGCCAACCA	550
CUGCUGCUCC CAGUAACGUG AGGGAGAGGU CUGGGUGGCG CAGACGGAAG	600
GUGUGUCUCU UGGCCAGCAC CUGCCCGCUC UCCUUGACGU GGCCUGAGAC	650
AUUGAGCAGC AUGGCCCCCU GGUCCACAAG AUGGGGCCGG UAUUCCUUGU	700
AGGCCACUGG CAUGGUCACA CGGUCCGAGG CCCUUGGUGC CAGCUCCACU	750
UCCUUCUUGG UCUCUUGAA GAUGGUACCA CUGACACCAG UAUAGAAAGU	800
GACUGAGAGG UAGAGGUGCA GUUUCACUGU GCGGCGGCG CUGCUGUGAU	850
UGAUCAGCAU CACAGAGACC AUCAGAUCCU GCCCAUCAC CGCGUCCUGU	900
GCCUCCACCU GCAUGGCCAC AUCCUCCGCU GAGCCCCGGU UGGCAUACAC	950
AUUGGGUUG CUGCCGUGGG CUGCUGCUGU CUCUACUGCC UCCGCGUCUG	1000

9	10
CGUCUGAGCC UUCUGGGUGC UUAUAGAGGU AGGUGAUGUC CUCCCGCAUG	1050
UUGGAGCUGA UGGCCUUUGU GACAAUGAGU GUGCCGAUGG CCUUCUCCUC	1100
CACAUAAACA AUCUUGAAGC UGCCAUCAUC CUGCCGCUGC CAGUACACCU	1150
UGUCACUAUU CACCUCAGCA AAAAUGAAAG GCGUGUCGUA CUUCAUGUAG	1200
ACCAGGCCAU UCUUGAUGGA CUCCACAGAG CAGGGGCCGC AGCAGAAGAU	1250
GCCACUGCUA GUCUCUUGGG GUGUGGCAUC CACCACCUGC CACCCAUCAA	1300
AGCCCGAGGG CAGAUCCGGC CUCUUAUCC AGCAGUCGUU CCACACAUGG	1350
AAGUUCGAGA CAGAAUCAUG GUUCAGGUGC UCCAGGGGCU UCAUGUUCUC	1400
GUCGAAGUAG AUGUCCAUGG UAAGGGAUGU GUCUGUGUCG UGGGCGGAGU	1450
UGAAGUUGGU GACAGUACGG GUGGCCAGAC CCAGGCAGCG CAGCACUGUG	1500
GUGGUCACUC CAGCAAAGAC CCAGCACUGG CCAUAGGGGA CGGAUAUCC	1550
CGUGCGUAGG UAGCUAAGCA GGAUCUCCAC GCUGCCACC CACGCUGAUG	1600
GGUUGGUGCC UCGGAGUAA UCACCAGACC AGUUCCCAU CAGGACUCCA	1650
UUGUCAUCCA GGGAGUUCAC CAUGGCAGAG AUGACCCGGG AGACAUUGAC	1700
UGGGUCUCCA CGGCCUCCAU AUGGCAUCC CCGCCGGUCC AGGAUGUAUA	1750
AGCAGGCAUC CAGCACCCCG UGGUCAAACU GGCCGUAGUU CCAGGUCCGC	1800
UCACCAAUCU GUGCUUCGGU CCCGUAGUAA AUUCUCCAG ACUCAUUAAG	1850
AACAUACUCC UGCCGCCAU CCUCAUGGUC CACGUACACA AUGUCCUCUG	1900
GGCACCAGGG GUUGAAGAGG AUGUAGAUU CAUUGCGGGG GUCAAAGGGC	1950
AACUGGAACU CCCAGCGUC UGAUUGUGUG CGGACUGUGA ACUGAAACUU	2000
GCCGAUGAUG GCGUUGGGG AAGUGUGGAC CCGCAGGUUC AGAUUCUGCC	2050
CACUGGCCUU GACCACCUGG GCUUUCAGC CUCCACUGCC CCCUUGCCC	2100
ACUGGGAUGA UCACGUGCGU GCCCUUGCCC ACCUCGGGGU UGUUUCGGAU	2150
GAGUAAUCA AGGGUGAUGC GAUCAGAGGA UUCAUAGGUC CGGGACAGGA	2200
GGAGGAGCAU AUGGAAAGGC UGCCCGCGGC GCACUAUCAG CUCGUCGUAC	2250
UCAUACUCGU CUGUGUGGUG CUCUCGGCGG UUCUGGUCCG AGCGCGAGCU	2300
CAGCAAGUCC ACACCGUUA CUACUAGCAU GCCCUCUCGG AUGGUGCCAU	2350
CUCCAGCUGC AUUGACACCG CUGCCCCGGG AUACAGGCCG GCGGGAGUCU	2400
GAGCCCCGGG AGCCAGGUCU UCGAGUGCCA GAGCUGGACC CUCGACCCCU	2450
GGAGUCAGAG GGUUCAGGUC CCCAGUCGUC AUCUGCCGA UUUCGGCAUG	2500
AACAGCAGCC ACAGCAGCGA GCCCAGAAGG AACGGCCUCC UCCUCUGCGA	2550
GAGCGUCCGU CUGGCUCUGG CUCUGGCUCU GGAGAUGGCG UGGUAGGGGG	2600
CUGCAAGGGG UUGCCACCCC AACGGCCAC AUCGGAACGU GGCCCAUCCA	2650
UCAUGCCUGG CAGCAGUGUU GGCAACCGCA GUACUGAGUC CUGGGGCUGA	2700
GAUGGAACAG GUCAGGAUGG AUGGGACAGG ACCC	2734

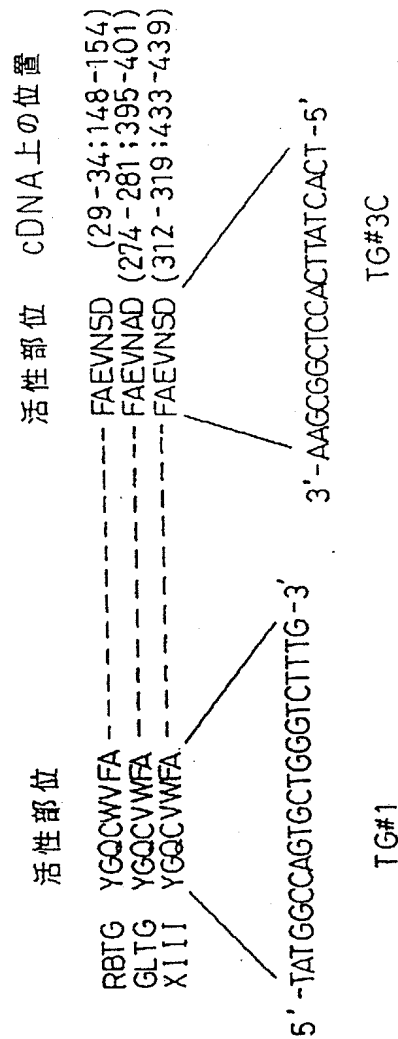
【図面の簡単な説明】

およびTG#3Cを示す。

【図1】 cDNAのPCRに用いたプライマーTG#1

【図1】

設計したプライマー



フロントページの続き

(72)発明者 土井 浩
 茨城県つくば市春日2-26-2 荻間ハイ
 ツC-106

(72)発明者 土田 衛
 茨城県つくば市春日2-26-2 荻間ハイ
 ツC-105